

PCT/JP03/09370

23.07.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D PCT/PTO

24 JAN 2005

REC'D 12 SEP 2003

WIBG

EAT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 4月24日

出願番号
Application Number: 特願2003-119178
[ST. 10/C]: [JP2003-119178]

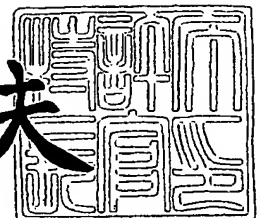
出願人
Applicant(s): 株式会社紅豆杉

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月29日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P19

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/05

【発明者】

 【住所又は居所】 富山県富山市五艘 1 3 5 7 - 1 7

 【氏名】 門田 重利

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市相原 5 - 3 森ビル 株式会社紅豆杉
 内

 【氏名】 信川 高寛

【特許出願人】

 【識別番号】 399015218

 【氏名又は名称】 株式会社紅豆杉

 【代表者】 信川 真貴子

【代理人】

 【識別番号】 100116816

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 藤原 道彦

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 123446

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0300321

【プルーフの要否】 要

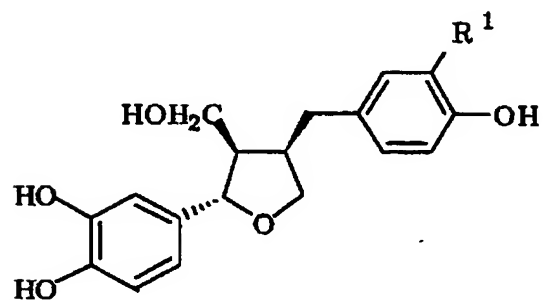
【書類名】 明細書

【発明の名称】 紅豆杉由来リグナン類を含む肝保護医薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

【化 1】 式 (1)

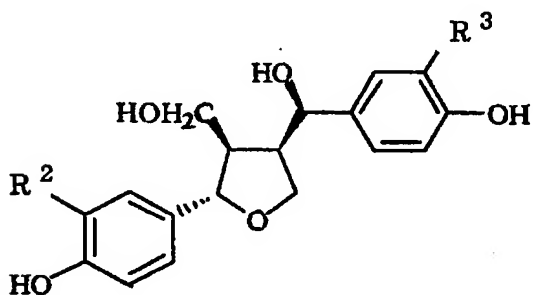


(式中 R¹ は炭素数 1 ～ 4 のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物を有効成分とする医薬。

【請求項 2】

【化 2】 式 (2)



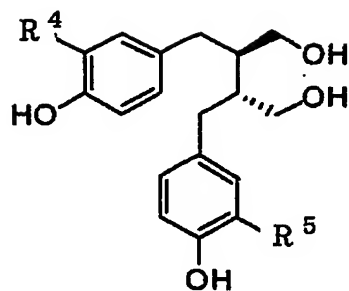
(式中 R²、R³ は炭素数 1 ～ 4 のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物を有効成分とする医薬。

【請求項 3】 医薬が、肝障害の予防及び／又は治療剤である請求項 1 乃至 2
いずれか記載の医薬。

【請求項 4】

【化3】式(3)

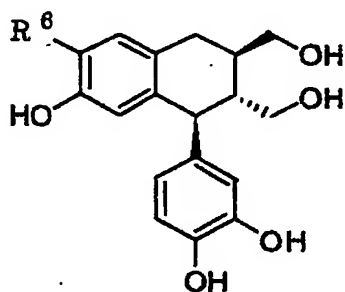


(式中 R⁴、R⁵ は炭素数 1 ～ 4 のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物を有効成分とする肝障害の予防及び／又は治療用医薬。

【請求項5】

【化4】式(4)



(式中 R⁶ は炭素数 1 ～ 4 のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物を有効成分とする肝障害の予防及び／又は治療用医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リグナン類化合物の医薬に関するものである。また、リグナン類化合物の肝保護、治療用医薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

肝臓は自然治癒力が強く少々の障害では表立った症状が表れないことから「沈黙の臓器」とも呼ばれ、物質代謝、血糖の調節、解毒、胆汁循環の調節、栄養素

の貯蔵等、人の生命の維持に不可欠な機能を担っている。肝機能障害の病因、病態は多種多様であるが、治療薬の開発が最も求められているのは医療ニーズの高い慢性活動性肝炎であり、本疾患を標的として肝保護薬をはじめ原因療法としての抗ウイルス剤や免疫調節薬など種々の治療薬の研究開発が活発に行われている。

【0003】

一方、中国の雲南省などに生息している高山植物である紅豆杉は、以前、中国政府が伐採禁止、売買禁止にし、手厚く保護されていたために、利用、研究が進められていなかった。ところが、近年、輸出もされるようになり、様々な疾病に効果があることが知られるようになってきた。

紅豆杉の植物体には驚異的な抗ガン作用を示すタキソールを始め、数十種類もの抗腫瘍活性成分が含まれていることが確認されている。また、タキサン誘導体が単離され、その抗ガン剤、抗アレルギー剤、糖尿病治療剤、血圧正常化剤としての効能が明らかにされている（例えば、特許文献1参照。）。

しかし、紅豆杉は貴重な植物として保護されていたため、その疾病回復作用があっても、紅豆杉に含まれる化合物とその化合物の効能については、いまだ解明の途上にある。

【0004】

そこで、発明者らは紅豆杉に含まれている化合物を鋭意研究し、医薬を発明するに至ったものである。

【0005】

【特許文献】

特願 2002-031328号公報

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

慢性活動性肝炎等の治療には、その性質上長期間に渡る薬剤の投与が必要であり、応々にして副作用が問題となる。従って、ウイルス、薬物中毒、アルコール等の肝疾患の原因を問わず高い治療効果を有する、より優れた肝疾患予防、治療薬の開発が待たれている。

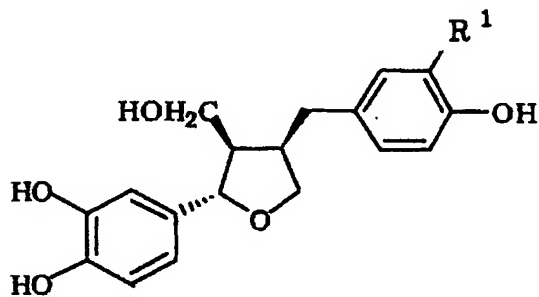
本発明は新規の医薬を提供することを課題とする。また、本発明は肝保護、治療用医薬を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

請求項1にかかる医薬は、

【化5】式(1)



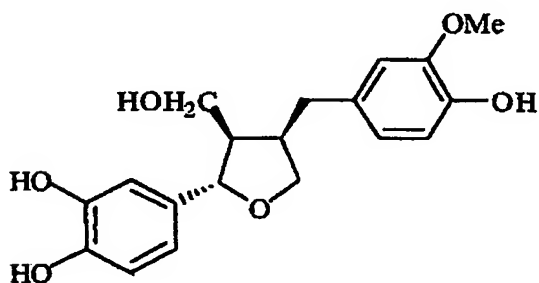
(式中R¹は炭素数1～4のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物を有効成分とする。

【0008】

式(1)で示されるリグナン類化合物の中で、R¹がメトキシ基である化合物、すなわち、

【化6】式(5)

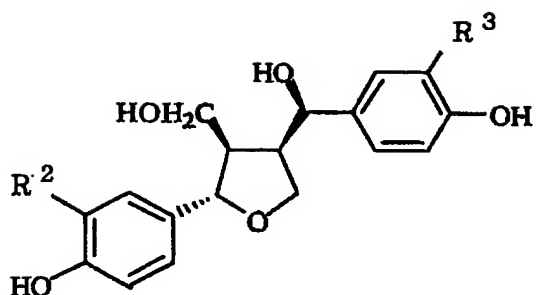


で示されるリグナン類化合物はタキシレシノール(Taxiresinol) (以下TAXと記す)である。

【0009】

請求項2にかかる医薬は、

【化7】式(2)

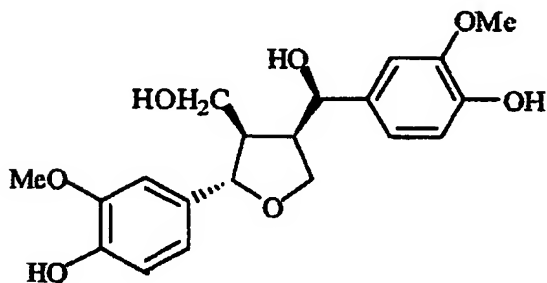


(式中 R^2 、 R^3 は炭素数 1～4 のアルキルオキシ基を表す)
で示される化合物を有効成分とする。

【0010】

式(2)で示されるリグナン類化合物の中で、 R^2 がメトキシ基、 R^3 がメトキシ基である化合物、すなわち、

【化8】式(6)



で示されるリグナン類化合物はハイドロキシラリシレシノール((7'R)-7'-Hydroxylariciresinol) (以下HYLと記す)である。

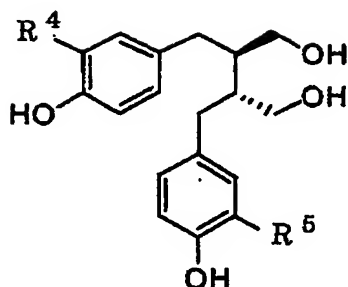
【0011】

請求項3にかかる医薬は、肝障害の予防及び／又は治療剤である請求項1乃至2いずれか記載の医薬である。

【0012】

請求項4にかかる肝障害の予防及び／又は治療用医薬は、

【化9】式(3)

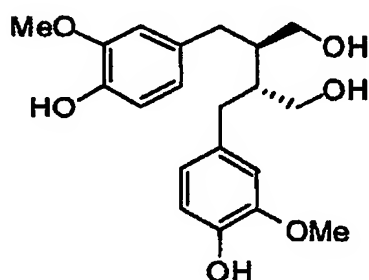


(式中R⁴、R⁵は炭素数1～4のアルキルオキシ基を表す)
 で示される化合物を有効成分とする。

【0013】

式(3)で示されるリグナン類化合物の中で、R⁴がメトキシ基、R⁵がメトキシ基である化合物、すなわち、

【化10】式(7)

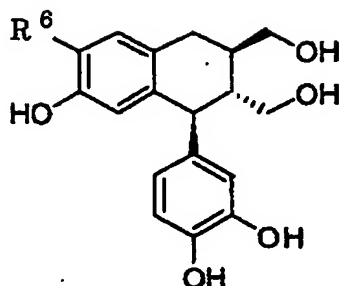


で示されるリグナン類化合物はセコイソラリシレシノール(Secoisolariciresinol) (以下SILと記す) である。

【0014】

請求項5にかかる肝障害の予防及び／又は治療用医薬は

【化11】式(4)

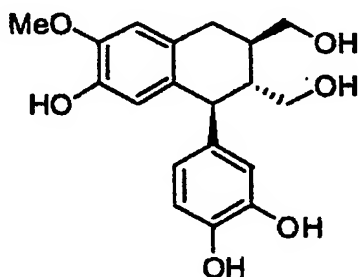


(式中R⁶は炭素数1～4のアルキルオキシ基を表す)
で示される化合物を有効成分とする。

【0015】

式(4)で示されるリグナン類化合物の中で、R⁶がメトキシ基である化合物、すなわち、

【化12】式(8)



で示されるリグナン類化合物はイソタキシレシノール(Isotaxiresinol) (以下ITXと記す) である。

【0016】

【発明の実施の形態】

TAX、HYL、SIL、ITXは紅豆杉から単離された。紅豆杉(タキサス・ユンナネンシス(*Taxus yunnanensis*))は、中国の雲南省などの高山に生育する樹木であり、中国では赤柏松、紫杉、紫金杉の別名でも呼ばれる。

TAX、HYL、SIL、ITXは紅豆杉の植物体(葉、樹皮、材部、芯部、根など)に含まれており、次のようにして抽出、単離することができる。まず、

紅豆杉の植物体を熱水抽出し水溶性分画を得る。次に、その水溶性分画を有機溶媒（例えば酢酸エチル）で抽出し有機溶媒分画を得る。さらに、その有機溶媒分画をクロマトグラフィー（カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、HPLCなど）を用いてリグナン類化合物を単離する。

【0017】

TAX、HYL、SIL、ITXは肝臓保護、治療効果を有する。TAXのメトキシ基 ($\text{CH}_3\text{O}-$) は、エトキシ基 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$)、プロピオキシ基 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{O}-$)、ブチロキシ基 ($\text{C}_4\text{H}_9\text{O}-$) に置換されても良い。HYLの2つのメトキシ基は、各々がエトキシ基、プロピオキシ基、ブチロキシ基に置換されても良く、また、2つのアルキルオキシ基は同一でも良く、異なっても良い。SILの2つのメトキシ基は、各々がエトキシ基、プロピオキシ基、ブチロキシ基に置換されても良く、また、2つのアルキルオキシ基は同一でも良く、異なっても良い。ITXのメトキシ基は、エトキシ基、プロピオキシ基、ブチロキシ基に置換されても良い。

【0018】

本発明の医薬は経口、非経口、又は経皮投与することができる。

投与に適した形態は例えば錠剤もしくは被覆錠、カプセル、溶液、シロップ、粉末、座薬を包含する。

【0019】

錠剤はリグナン類化合物を、例えば乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニットなどの賦形剤；コーンスターチ、アルギン酸などの崩壊剤；スターチ、ゼラチンなどの結合剤；ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤；および／またはカルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートフタレート、ポリビニルアルコールなどの遅延放出を与える剤を混合することにより製造できる。錠剤はいくつかの層からなってもよい。

被覆錠は錠剤と同様にして製造した芯を錠剤被覆に通常用いられる物質、例えばコリドン(collidone)、シェラック(shellac)、アラビアゴム、タルク、二酸化チタン、ショ糖などで被覆することにより製造できる。遅延放出を得るべく芯はいくつかの層からなってもよく、また錠剤についての上記賦形剤を用いるこ

とができる。

【0020】

液剤、シロップの剤型にするには、リグナン類化合物に、水、エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ショ糖、トレハロース、マルトース、フラクトース、ソルビット、蜂蜜などの糖類、パラベンなどの防腐剤、各種香料、着色料、大豆油などの油類を適宜添加、混合して調製することができる。

【0021】

本発明にかかるリグナン類医薬を含有するカプセルは、有効成分をゼラチンカプセルに封入し、または有効成分と例えばラクトース、ソルビトールなどの不活性担体を混合し、混合物をゼラチンカプセルに封入、またはゼラチン膜で被包成形して製造することができる。

【0022】

【実施例】

以下に実施例により本発明をさらに説明する。この発明の実施例に記載されている原材料、化合物の抽出法などは、この発明の範囲をそれらのみに限定する趣旨のものではなく、単なる説明例にすぎない。

【0023】

(抽出・単離)

紅豆杉は株式会社紅豆杉から入手した。紅豆杉の材部及び樹皮（合わせて木部）を粉碎機で粉碎し、30メッシュパスの木屑状粉末を得た。その乾燥粉末850グラム（以下gと記す）を4リッター（以下Lと記す）の水で30分間還流抽出した。濾過後、残渣に4Lの水を加えて30分間還流抽出した。さらに同じ還流抽出操作を1回繰り返した。3回の水抽出液を合わせて減圧濃縮し、水抽出分画52.5gを得た。

次に、水抽出分画50.0gを500ミリリットル（以下mLと記す）の酢酸エチルで抽出し酢酸エチル層を分離した。分離後、残渣に500mLの酢酸エチルを加えて抽出した。さらに同じ抽出操作を1回繰り返した。3回の抽出操作で得た酢酸エチル層を合わせて減圧濃縮し、酢酸エチル分画34.1gを得た。

【0024】

さらに、シリカゲルカラム（内径 3.5 cm、長さ 60.0 cm、充填物：Si lica gel 60（ナカライテスク株式会社）に前記酢酸エチル分画 32.0 g を添加し、クロロホルムにメタノールを添加した溶媒を使用して、溶出操作を行い 500 mL 毎の 9 分画を得た。溶媒の組成と、各分画液体を減圧濃縮して得た流出物の重量、分画中に含まれる成分を表 1 に示した。

【表 1】

紅豆杉水抽出分画の酢酸エチル可溶分画のカラムクロマトグラフィー

分画 番号	溶媒の組成 (※1) MeOH %	重量 g	成分
1	0	0.31	
2	0	0.30	
3	1	0.30	
4	1～5 (※2)	2.78	SIL
5	5	1.68	SIL、TAX、 HYL
6	10	12.5	
7	10～20 (※3)	7.84	ITX
8	20	1.41	
9	30	1.00	

(※1) 溶媒はクロロホルムとメタノールの混合液であり、
表中の値はメタノールの混合百分率を示す

(※2) 1%：100mL、2%100mL、3%100mL、
4%：100mL、5%：100mLによる溶出物を混合した分画

(※3) 12%：100mL、14%100mL、16%100mL、
18%：100mL、20%：100mLによる溶出物を混合した分画

【0025】

第 5 分画の流出溶液を減圧濃縮後に、結晶化した SIL（840 mg）を得た。続いて、その残渣を分取薄層クロマトグラフィーにより分離した。薄層板は Kieselgel 60 F 254 厚さ 0.50 mm（メルク社）を使用し、展開溶媒はメタノール：クロロホルム／10：90 溶液を使用した。Rf 値は、TAX：0.25、HYL：0.21 であった。また、同条件で SIL の Rf 値は 0.36 であった。

た。分取の結果、TAX (38.9 mg)、HYL (10.2 mg) を得た。

【0026】

TAX、HYL、SIL、ITXの構造式は、分光学的および化学的な分析に基づき、決定、確認した。その結果、TAX、SIL、ITXの構造式は、文献1に記載された構造式と一致した。(文献1: Banskota AH, Usja T, Tezuka Y, Kouda K, Nguyen NT, Kadota S. Three new C-14 oxygenated taxanes from the wood of *Taxus yunnanensis*. J Nat Prod 2002; 65: 1700-2) また、HYLの構造式は文献2に記載された構造式と一致した。(文献2: Barrero AF, Haidou r A, Dorado MM, Gravalos D, Quesada TG. Lignans from the wood of *Abies pinsapo*. J Nat Prod 1994; 57: 713-9)

各化合物の旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ はSIL: -32.0° (c 0.10、アセトン)、ITX: $+47.3^\circ$ (c 0.44、エタノール)、TAX: $+23.0^\circ$ (c 0.32、エタノール)、HYL: $+4.6^\circ$ (c 0.18、メタノール) であった。

【0027】

本発明にかかる化合物の肝障害に対する予防、治療作用を以下の方法により試験した。

【0028】

(試験例1)

(D-ガラクトサミン (D-galactosamine: 以下D-GalNと略す) / リポポリサッカライド (Lipopolysaccharide: 以下LPSと略す) 誘発肝障害モデル (J. Wang et al., Biochem. Pharm. 39, 267 (1990), A. Wendel et al., Biochem. Pharm. 35, 2115 (1986)) による評価)

12時間絶食したddY系雄性マウス(6週齢)の腹腔内にD-GalN (700 mg/kg) / LPS (10 μ g/kg) を注射して肝障害を惹起した。被検薬はD-GalN / LPSを注射する前の12時間及び1時間前に計2回皮下投与した。2群の被検薬投与群を設け、1群は投与量50 mg/kgとし、他群は投与量10 mg/kgとした。対照群(Control)には生理食塩水を同様に投与した。また、薬効比較のために既存の肝臓保護薬であるシリマリン(silymarin

投与群（皮下投与：100mg/kg）を設けた。D-GalN/LPS注射の90分後に血中の腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor alpha)（以下TNF- α と略す）の値を測定した。また、8時間後に血中のアミノ基転移酵素（GPT(glutamic pyruvic transaminase)とGOT(glutamic oxaloacetic transaminase)）の値を測定した。

TNF- α はTNF- α 抗体(anti-mouse TNF- α antibody)(Endogen, Inc., USA)を用いるELISA法によって測定した。GPT、GOTはTransaminase CII-Test kit（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。

【0029】

本障害モデルにおいて誘発される肝障害機構は、免疫担当細胞の活性化、肝組織への浸潤、ロイコトリエンD4やTNF- α 等のオートコイド、サイトカインの分泌、肝細胞のアポトーシスなど一連の過程を経由するため、免疫学的肝障害発生のモデルとして臨床成績との相関性が高いと考えられる。

【0030】

アミノ基転移酵素量の測定結果を図1と図2のグラフに示す。

グラフの縦軸は血清中のアミノ基転移酵素量をIU/Lで示す。NormalはD-GalN/LPS非処理群を表す。Controlは生理食塩水を投与した群を表す。TAX50~ITX10はリグナン類の化合物名と投与量を表す。SIはシリマリン投与群を表す。Normal群のマウス個体数は3であり、その他の実験群のマウス個体数は6である。

測定値は平均値と標準偏差で示し、また、各グラフ上の*印は、スチューデントのt検定の結果、* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ でControl群との間の有意差があることを示す。測定値とt検定の表示は図3~6についても同じである。

【0031】

TAXは、10mg/kgと50mg/kgの投与量で、血清中GPTの上昇をそれぞれ54%、68%抑制し、また血清中のGOT上昇をそれぞれ49%、60%抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

HYLは、10mg/kgと50mg/kgの投与量で、血清中GPTの上昇

をそれぞれ 55%、62%抑制し、また血清中の G O P 上昇をそれぞれ 49%、58%抑制し、有意義な肝障害抑制作用を示した。

S I L は、10mg/kg と 50mg/kg の投与量で、血清中 G P T の上昇をそれぞれ 48%、88%抑制し、また血清中の G O P 上昇をそれぞれ 57%、84%抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

I T X は、10mg/kg と 50mg/kg の投与量で、血清中 G P T の上昇をそれぞれ 75%、86%抑制し、また血清中の G O P 上昇をそれぞれ 75%、84%抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

【0032】

T N F - α の測定結果を図 3 と図 4 のグラフに示す。

グラフの縦軸は血清中の T N F - α 量を pg/mL で示す。Control は生理食塩水を投与した群を表す。T A X 50 ~ I T X 10 はリグナン類の化合物名と投与量を表す。S I はシリマリン投与群を表す。各実験群のマウス個体数は 6 である。

また、D - G a l N / L P S 非処理群（マウス個体数：3）の血清 T N F - α 量は検出限界（10 pg/mL）以下であったため、図示していない。

【0033】

T A X は、10mg/kg と 50mg/kg の投与量で、血清中 T N F - α 上昇をそれぞれ 64%、73%抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

H Y L は、10mg/kg と 50mg/kg の投与量で、血清中 T N F - α 上昇をそれぞれ 68%、70%抑制し、有意義な肝障害抑制作用を示した。

S I L は、10mg/kg と 50mg/kg の投与量で、血清中 T N F - α 上昇をそれぞれ 66%、73%抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

I T X は、10mg/kg と 50mg/kg の投与量で、血清中 T N F - α 上昇をそれぞれ 58%、74%抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

【0034】

(試験例 2)

(TNF- α 誘発マウス初代培養肝細胞死に対する抑制活性)

ddY系雄マウスの肝臓からコラゲナーゼ灌流法の変法で分離した肝実質細胞を、10%ウシ血清、ペニシリンG 100 IU/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL、デキサメタゾン 100 μ M、インスリン 50 ng/mLを補充したウイリアムスE (William's E)培地に懸濁し、96ウェルのプラスチックプレートに1ウェル当たり 1.5×10^4 Cellsを配布した。2時間予備培養した後、D-ガラクトサミン 0.5 mMおよびリグナン類を含む新鮮な培地に置き換えた。30分後、TNF- α 100 ng/mLを加えた。18時間後、MTT発色反応を用いて生存肝細胞数を計測した。

【0035】

結果を図5と図6のグラフに示す。

グラフの縦軸は細胞生存割合を百分率で示す。NormalはTNF- α 非添加の培地中での細胞生存割合を示す。Controlはリグナン類非添加の培地中での細胞生存割合を示す。

リグナン類は培地中に200、100、50、10 μ モル (μ M)の濃度で添加した。それぞれの細胞生存割合を4本の棒グラフで示す。

【0036】

TAXを培地に添加すると、肝細胞の生存割合はControlと比較して用量依存的、かつ有意義に上昇した。

HYL、SIL、ITXを培地に添加した場合も、TAXの添加と同様な試験結果であった。

【0037】

【発明の効果】

請求項1と請求項2にかかる医薬は新規な医薬である。請求項3、請求項4、請求項5にかかる医薬は、肝障害の予防、治療に用いることが出来る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 マウス血清中のアミノ基転移酵素量の測定結果を示すグラフである。

。

【図 2】 マウス血清中のアミノ基転移酵素量の測定結果を示すグラフである

。

【図 3】 マウス血清中の $\text{TNF-}\alpha$ の測定結果を示すグラフである。

【図 4】 マウス血清中の $\text{TNF-}\alpha$ の測定結果を示すグラフである。

【図 5】 培養肝細胞死に対する抑制活性の測定結果を示すグラフである。

【図 6】 培養肝細胞死に対する抑制活性の測定結果を示すグラフである。

【符号の説明】

TAX タキシレシノール

HYL ヒドロキシラリシレシノール

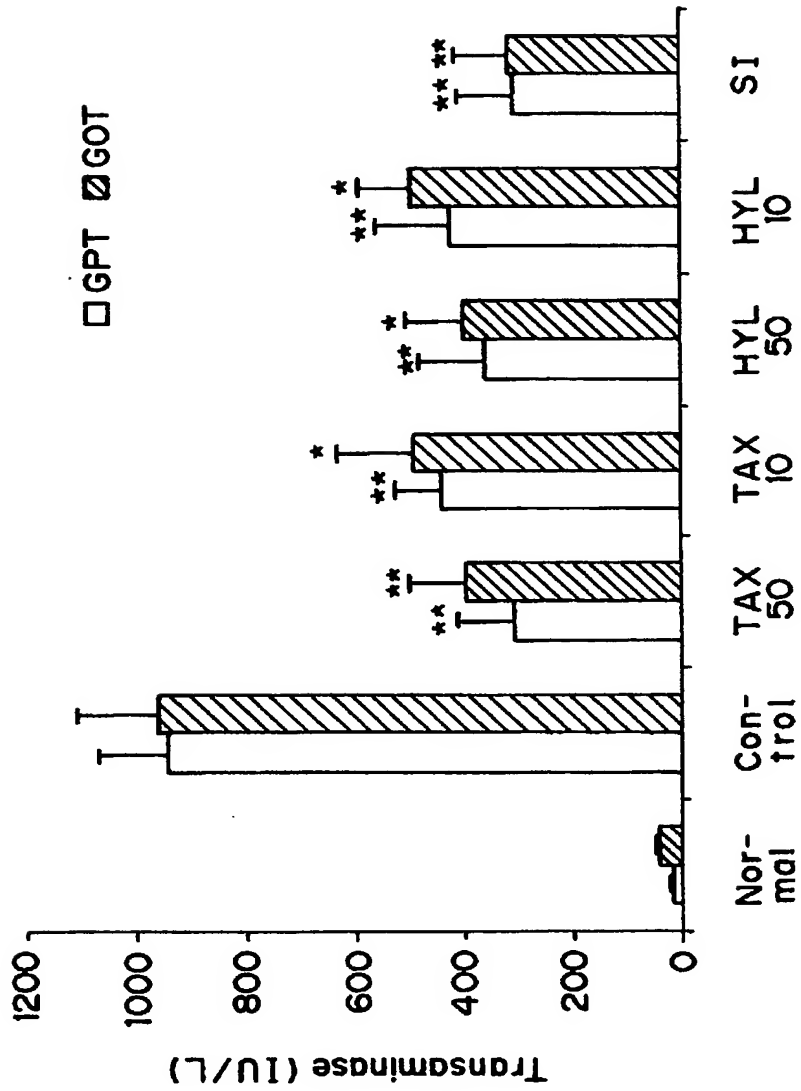
SIL セコイソラリシレシノール

ITX イソタキシレシノール

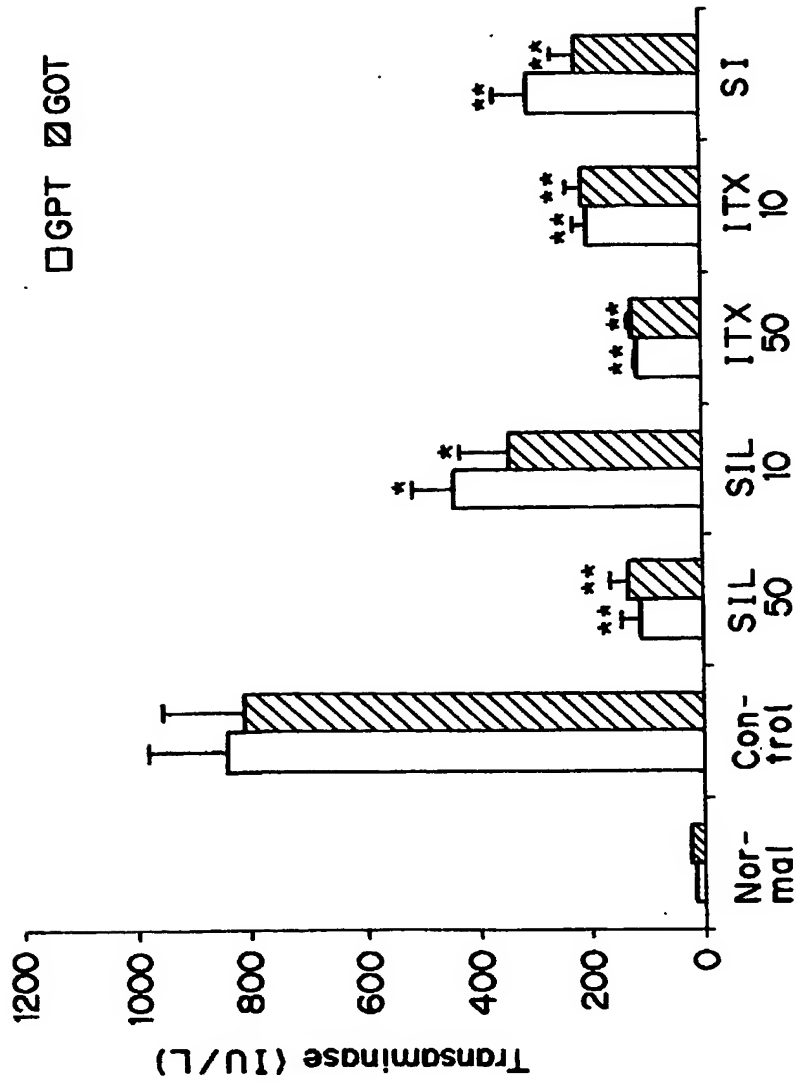
【書類名】

図面

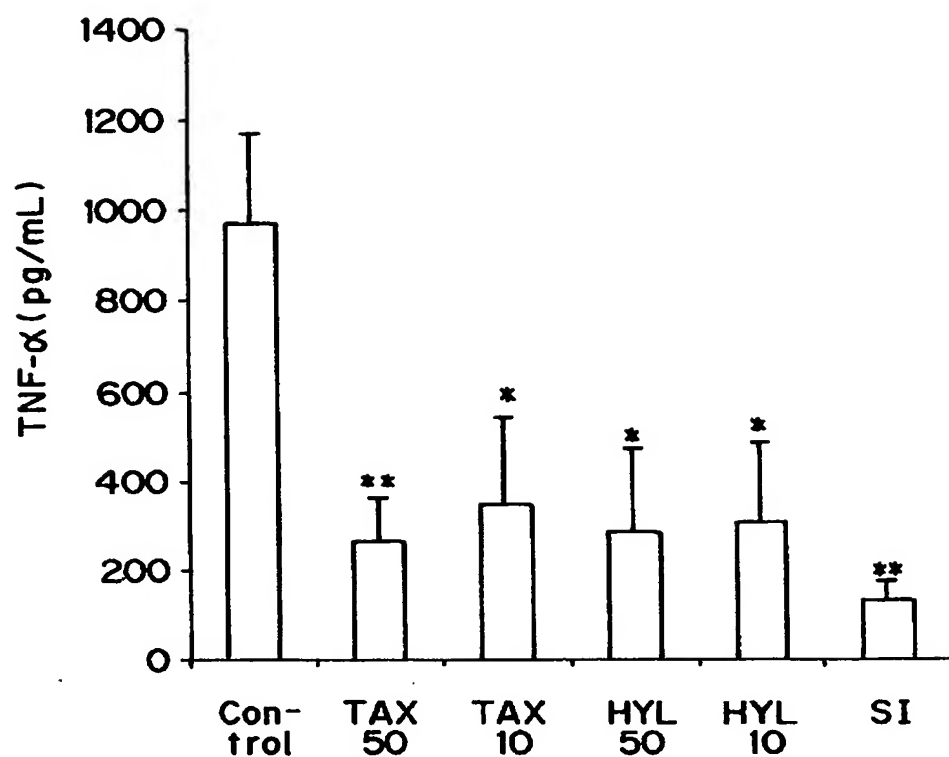
【図 1】



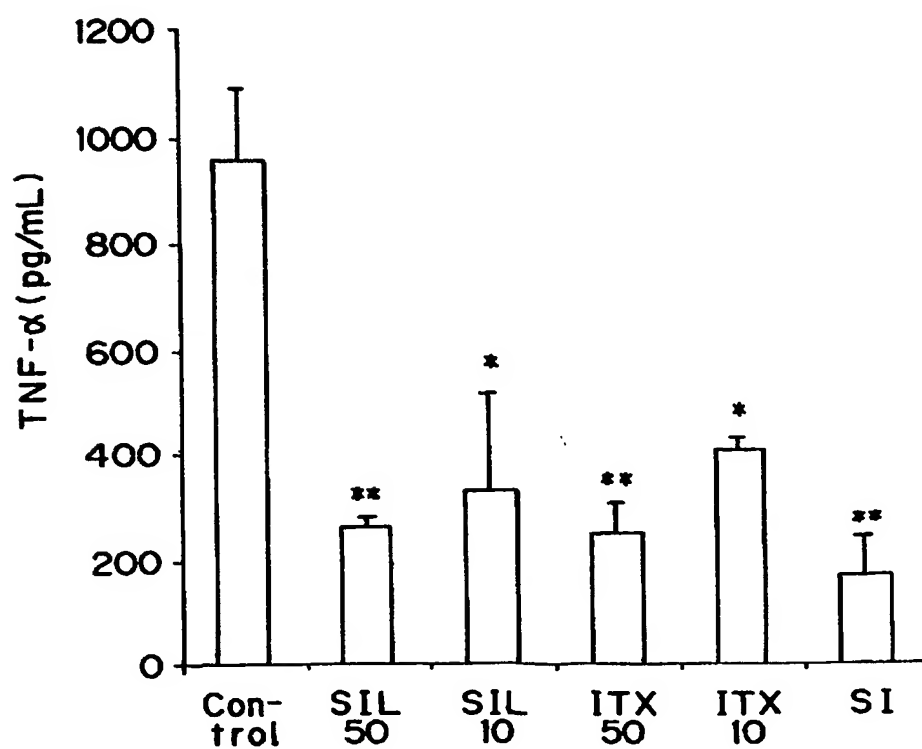
【図 2】



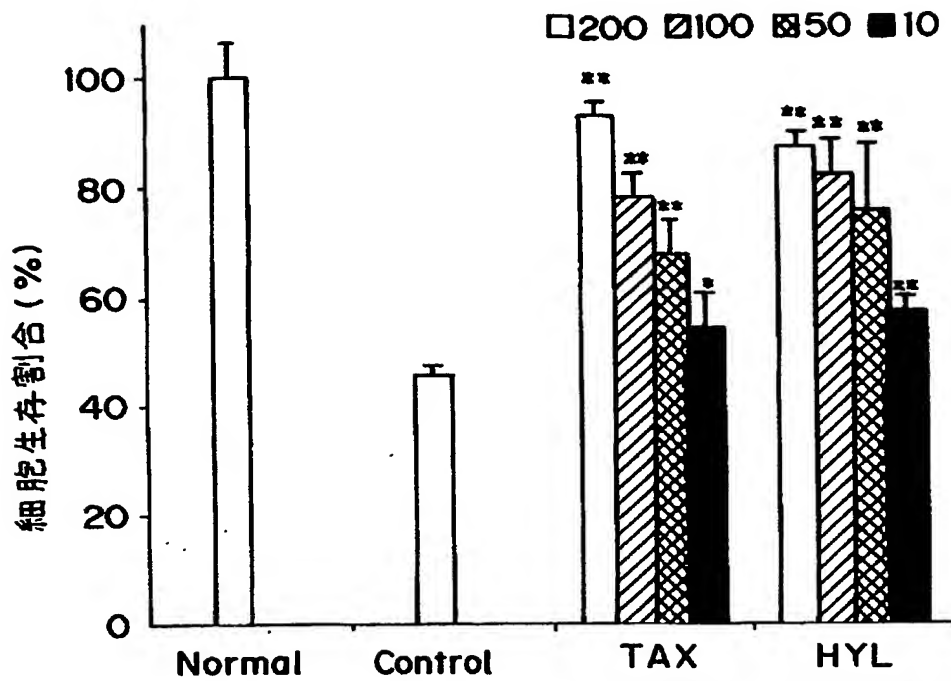
【図 3】



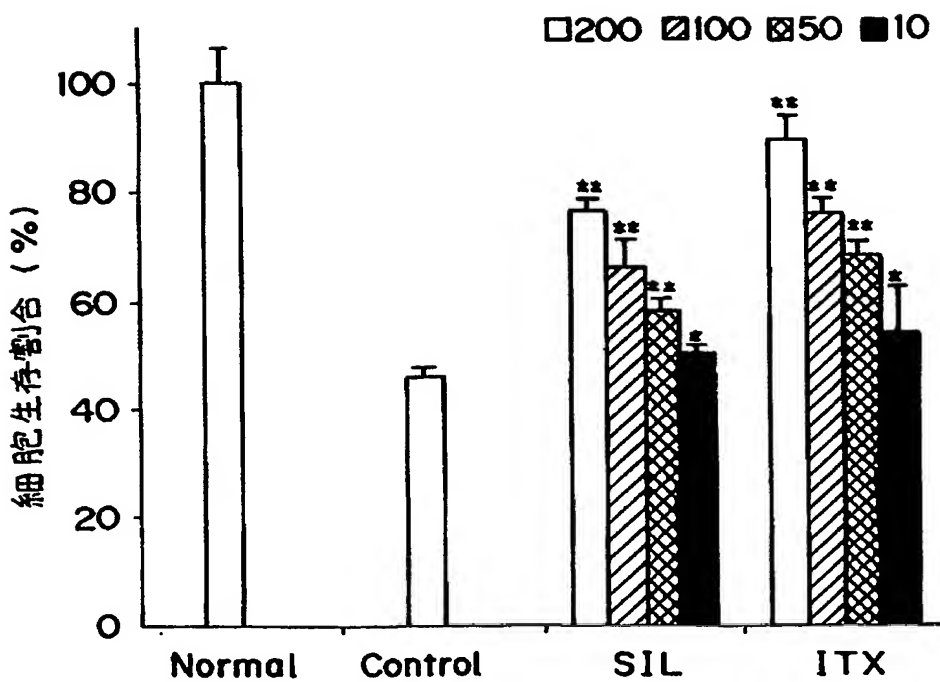
【図 4】



【図5】



【図6】



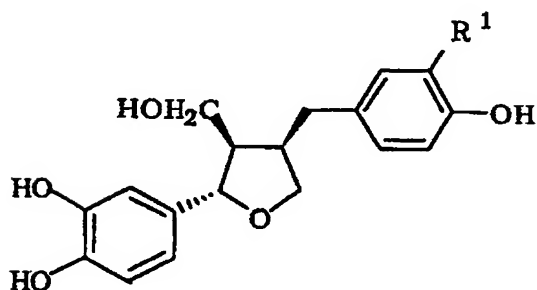
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 肝保護、治療用医薬を提供する。

【解決手段】 紅豆杉（タキサス・ユンナネンシス (*Taxus yunnanensis*)）から単離されたリグナン類化合物（タキシレシノール (*Taxiresinol*) (式 (1))、ハイドロキシラリシレシノール ((7'R)-7'-Hydroxylariciresinol)、セコイソラリシレシノール (*Secoisolariciresinol*)、イソタキシレシノール (*Isotaxiresinol*) 及びその誘導体を有効成分とする医薬である。

【化1】 式 (1)



(式中 R^1 は炭素数 1 ~ 4 のアルキルオキシ基を表す)

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-119178
受付番号	50300681586
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 4月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 4月24日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-119178

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[399015218]

1. 変更年月日

2000年10月24日

[変更理由]

住所変更

住 所

神奈川県相模原市相原5-3 森ビル

氏 名

株式会社紅豆杉